

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58-96052

⑪ Int. Cl.³
C 07 C 103/52
102/00
// A 61 K 37/24

識別記号
1 0 7

庁内整理番号
7375-4H
7375-4H
7138-4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)6月7日

発明の数 1
審査請求 未請求

Toyo Soda

(全 20 頁)

⑭ 高活性 h-PTH (1-34) アミドの製造法

① 特 願 昭56-193212
② 出 願 昭56(1981)11月30日
③ 発 明 者 船越奨

④ 出 願 人 京都市左京区一乗寺川原田町44
東洋醸造株式会社
静岡県田方郡大仁町三福632の
1

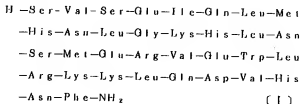
明 細 書

1. 発明の名称

高活性 h-PTH (1-84) アミドの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 式

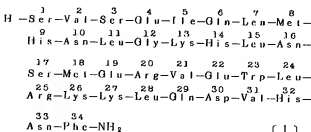


で表わされる h-PTH (1-84) アミドまたはその塩を製造するに当り、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式(I)のアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護されたペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離し、得られた h-PTH (1-84) アミドをグルコースおよび吸着剤を用いるカラムクロマトグラフィーにより分離精製することを経

とする高活性 h-PTH (1-84) アミドの製造法。

3. 発明の詳細を説明

本発明は、ヒト副甲状腺ホルモン(h-PTH) (1-84) アミドの製造法に関する。さらに詳しくは、本発明は、式



で表わされるペプチドまたはその塩を製造するに当り、C末端フェニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式(II)のアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離し、得られた h-PTH (1-84) アミドをグルコースおよび吸着剤を用いるカラムクロマトグラフィー

イーにより分離精製することを特徴とする高活性
h-P⁺TH(1-34)アミドの製造法である。

式〔I〕で表わされるh-P⁺TH(1-34)アミドは、元のh-P⁺TH(1-34)より1.5～2倍のh-P⁺TH活性を有し、しかもこれを抗原として得られる抗体はh-P⁺THと免疫交叉活性を有する。このため、本ペプチドは副甲状腺機能低下症治療剤および副甲状腺機能検査のための抗体調製用ペプチドとして有用である。

本発明のペプチド〔I〕は、C末端フエニルアラニル基のカルボキシル基をアミド基に転化し、式〔I〕で示されるアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および（または）保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階でN末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離することにより得られる。縮合反応自体はペプチド合成のための常法手段に従つて、保護基の脱脱、縮合反応を繰り返すことにより行われる。即ち、本ペプチド〔I〕の原料ならびにすべての中間体の製造にお

- 3 -

トリル-イソプロポキシカルボニル基、2-p-ジフエニル-イソプロポキシカルボニル基などのアラキルオキシカルボニル基などがある。またこれらアミノ基をベンジルアセトン、アセチルアセトンなどの1, 3-ジクトンと反応させることによつて得られるエナミンの形成により保護することが出来る。

カルボキシル基は、アミド形成、ヒドラチド形成またはエステル化によつて保護される。即ちアミド基は、3, 4-ジメトキシベンジル基、ビス-(p-メトキシフェニル)メチル基などによつて置換される。ヒドラチド基はベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、1-ブチルオキシカルボニル基、トリチル基、2-p-ジフエニル-イソプロポキシカルボニル基などによつて置換される。エステル基はメタノール、エタノール、1-ブタノール、シプロメチルアルコールなどのアルカノール、ベンジルアルコール、p-メトキシベンジルアルコール、p-クロロベンジルアル

コール、2, 6-ジクロロベンジルアルコール、p-メトキシベンジルアルコール、p-ニトロベンジルアルコール、ペンゼヒドリルアルコール、ベンゾイルメチルアルコール、p-クロロベンゾイルメチルアルコールなどのアルカノール、2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、2, 4-ジニトロフェノールなどのフェノール、チオフエノール、p-ニトロチオフエノールなどのチオフエノールなどによつて置換される。

例え、アミノ基に使用する保護基としては、ホルミル基、トリフルオロアセチル基、フタロイル基、p-トルエンシルボニル基、o-ニトロフェニルスルフェニル基などのアシル基、ベンジルオキシカルボニル基、o（またはp）-プロモベンジルオキシカルボニル基、o（またはp）-クロロベンジルオキシカルボニル基、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基などのベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボニル基、1-ブチルオキシカルボニル基、1-アミルオキシカルボニル基、ジノ^αビルメチルオキシカルボニル基などの脂肪族オキシカルボニル基、2-フエニル-イソプロポキシカルボニル基、2-

- 4 -

ール、2, 6-ジクロロベンジルアルコール、p-メトキシベンジルアルコール、p-ニトロベンジルアルコール、ペンゼヒドリルアルコール、ベンゾイルメチルアルコール、p-クロロベンゾイルメチルアルコールなどのアルカノール、2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、2, 4-ジニトロフェノールなどのフェノール、チオフエノール、p-ニトロチオフエノールなどのチオフエノールなどによつて置換される。

前記セリンの水酸基は、例えエステル化またはエーテル化によつて保護することが出来る。このエステル化に適する基としては、例えアセチル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基などである。またエーテル化に適する基としては、例えベンジル基、テトラヒドロ^βニル基、1-ブチル基である。これらの水酸基の保護は2, 2, 2-トリ

フルオロー1-1-1-ブチルオキシカルボニルアミノエチル基、2, 2, 2-トリフルオロー1-ベンジルオキシカルボニルアミノ基も適する。しながら、これらの水酸基を必ずしも保護する必要はない。

前記アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基を保護するのに使用する基としては、例えばトリロ基、トリル基、ベンジルオキシカルボニル基、メシチレン-2-スルホニル基などであるが、このグアニジノ基を必ずしも保護する必要はない。

前記ヒスチジンのイミノ基を保護するのに使用する基としては、例えばベンジル基、トリチル基、ベンジルオキシカルボニル基、トリル基、2, 2, 2-トリフルオロー1-1-ブチルオキシカルボニルアミノエチル基、2, 2, 2-トリフルオロー1-ベンジルオキシカルボニルアミノエチル基などであるが、このイミノ基を必ずしも保護する必要はない。

前記のメチオニンのチオメチル基はメチルスルホキシド基にして副反応を防止するのが好ましい。

- 7 -

ペプチドと遊離の末端カルボキシル基および保護された α -アミノ基をもつアミノ酸またはペプチドを反応させることにより、実施することができる。

この場合、カルボキシル基は、例えば酸アジド、酸無水物、酸イミダゾリドまたは活性エステル、例えばシアノメチルエステル、チオフェニルエステル、*p*-ニトロチオフェニルエステル、*p*-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、2, 4, 5-トリクロロフェニルエステル、2, 4, 6-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、*N*-ヒドロキシホク酸イミドエステル、*N*-ヒドロキシフタル酸イミドエステルなどに要換することによって活性化することができる。またカルボジイミド、例えば N , N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド、 N -エチル- N' -3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、 N , N' -カルボニル-ジイミダゾールまたはイソオキゾリウム塩、例えばウツドワート反応剤などの縮合剤を使用して反応さ

が、必ずしも酸化して保護する必要はない。

本発明においては、 α -アミノ基の保護に1-ブチルオキシカルボニル基、*p*-ノトキシベンジルオキシカルボニル基を用い、*N*末端の α -アミノ基および側鎖のアミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル基を用い、 α -カルボキシル基の保護にメチルエステル基、ベンジルエステル基を用い、側鎖のカルボキシル基の保護にベンジルエステル基を用い、セリンの水酸基を全く保護する場合に、その保護基にベンジル基を用い、アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基の保護にメシチレン-2-スルホニル基を用いるのが好ましい。

本目的化合物(1)の合成においては、個々のアミノ酸および(または)低級ペプチドの縮合は、例えば保護された α -アミノ基および活性化末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドと遊離の α -アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドとを反応させるか、あるいは活性化 α -アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸または

- 8 -

せることによって活性化することができる。

本発明において好ましい縮合方法は、アジド法、活性エステル法およびカルボジイミド法である。縮合の各段階ではラセミ化が起らない方法または、ラセミ化が最少になる方法を用いるのが望ましく、好ましくはアジド法、活性エステル法、ピュンシュ法、(Z, Naturforsch., 21b, 426(1966))またはガイガー法(Chem Ber., 108, 788(1970))などを用いるのが適する。

縮合順序は式(1)で示されるアミノ酸順序であれば、如何なる順序からも合成し得るが、*C*-末端側から順次アミノ酸および(または)ペプチドを連結させるのが好ましい。

例えば、29~84番のアミノ酸順序からなる*C*-末端フラグメントと25~28番のアミノ酸からなるペプチドフラグメントを縮合させるのがよい。この*C*-末端フラグメントとテトラペプチド25~28を縮合させるにはアジド法によつて行うのが適する。得られた*C*-末端フラグメント25~84の前に22~24番のアミノ酸順序か

らなるペプチドフラグメントを連結させるのであるが、ガイガー法により行うのが適する。得られたC-末端フラグメント22-34の前に順次19~21番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、16~18番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、13~15番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、8~12番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメント、4~7番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメントおよび1~3番のアミノ酸順序からなるペプチドフラグメントを連結させるのが好ましい。

これらの結合はアジド法で行うのが適する。

前記のC-末端フラグメント25-34は、C-末端フラグメント29-34にその残りのアミノ酸順序25-28からなるペプチドフラグメントをアジド法により連結させるのがよい。C-末端フラグメント29-34は、~~ペプチド~~ペプチドフラグメント38-34に~~ペプチド~~ペプチドフラグメント31-32をアジド法により連結させ、その前に残りのアミノ酸順序に各々のアミノ酸を活性エス

テル法により連結させるのがよい。

上記の結合反応における α -アミノ基の保護基、例えば1-フチルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基はトリフルオロ酢酸で脱離される。 α -カルボキシ基の保護基、例えばメチルエステルはこれを希薄な水酸化ナトリウム溶液で分解またはヒドラチドあるいはトリクロロエトキシカルボニルヒドラチドのような保護ヒドラチドに置き、またベンジルエステル基は無水希酸化水素分解、水素添加分解によつて分解し、またはヒドラチドに変えることができる。

こうして保護されたN末端 α -アミノ基、~~1-アミノ基、~~2-アミノ基、3-アミノ基、4-アミノ基、5-アミノ基、6-アミノ基、7-アミノ基、8-アミノ基、9-アミノ基、10-アミノ基、11-アミノ基、12-アミノ基、13-アミノ基、14-アミノ基、15-アミノ基、16-アミノ基、17-アミノ基、18-アミノ基、19-アミノ基、20-アミノ基、21-アミノ基、22-アミノ基、23-アミノ基、24-アミノ基、25-アミノ基、26-アミノ基、27-アミノ基、28-アミノ基、29-アミノ基、30-アミノ基、31-アミノ基、32-アミノ基、33-アミノ基、34-アミノ基~~側鎖カルボキシ基グアニジノ基および(または)水酸基を有するテトラトリコンタペプチドが得られる。これらの保護基は、好ましくは酸分解、例えば無水希酸化水素またはトリフルオロメタンスルホン酸による方法によつて一段階で脱離され、式(1)の目的化合物が得られる。メチオニンのメチルスルホキシド基をチオメチル基に還元する場合には、ジチオ~~

- 11 -

スレイトール、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、エタンジチオールなどによつて行つてもよい。

このようにして得られたペプチド(1)は、ペプチドまたは蛋白質を精製する公知の手段によつて分離精製することができる。例えば、セファデックスG-25、セファデックスG-50、セファデックスLH-20などのゲル濾過剤を用いるゲル濾過、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどにより行うことができる。

本発明のペプチド(1)は、その方法の条件により塩基またはその塩の形で得られる。塩としては、無機酸塩、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩である。

本ペプチド(1)はある種の無機物質または有機物質を付加して錯体を形成し得る。この錯体とは添加した時に生成し、ペプチドに持続作用を与

- 12 -

える化合物を意味する。

尚、本明細書中に記載の略記号は次の意味を有する。

Phe; L-フェニルアラニン

Tyr; L-チロシン

Asn; L-アスパラギン

His; L-ヒスチジン

Met; L-メチオニン

Val; L-バリン

Asp; L-アスパラギン酸

Gln; L-グルタミン

Leu; L-ロイシン

Lys; L-リジン

Arg; L-アルギニン

Trp; L-トリプトファン

Glu; L-グルタミン酸

Ile; L-イソロイシン

Ser; L-セリン

Gly; グリシン

Z; ベンジルオキシカルボニル

Boc; t-ブトキシカルボニル

Z(OMe); β -メトキシベンジルオキシカルボ
ニル

Mis; N-メシチレン-2-スルホニル

OBzl; ベンジルエステル

OMe; メチルエステル

OTCP; 2, 4, 5-トリクロロフェニルエステル

ONp; β -ニトロフェニルエステル

OSu; N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル

NHNHTroc; トリクロロエチルオキシカルボニルヒド
ラジドNHNH₂; ヒドラジド

TFMSA; トリフルオロメタンスルホン酸

MSA; メタンスルホン酸

TFA; トリフルオロ酢酸

TosOH; p-トールエンスルホン酸

H₂C; 塩化水素Et₃N; トリエチルアミン

CHA; シクロヘキシルアミン

DCHA; シシクロヘキシルアミン

EDT; エタンジチオール

- 15 -

DCC; N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

HOBT; 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

EDTA; エチレンジアミン四酢酸塩

DMP; ジメチルホルムアミド

DMSO; ジメチルスルホキシド

HMPA; ヘキサメチルホスホルアミド

MeOH; メタノール

EtOH; エタノール

BuOH; γ -ブチanolCHCl₃; クロロホルム

THF; テトラヒドロフラン

エーテル; ジエチルエーテル

TLC; 薄層クロマトグラフィー

次に実施例を挙げて本発明の製造例を具体的に
説明する。尚、これら実施例で使用した薄層クロマトグラ
フィー (TLC) の担体および展開溶媒系、アミ
ノ酸分析の条件並びにPTH活性測定法は次の通
りである。

< TLC >

担体; シリカゲルG

- 16 -

溶媒系;

1. CHCl₃ - MeOH (10:0.5)
2. CHCl₃ - MeOH - 水 (8:3:1) の下層
3. CHCl₃ - MeOH-酢酸 (9:1:0.5)
4. BuOH - ピリジン-酢酸-水 (4:1:1:2)

担体; セルロース (メルク社製, DC-A10 (f
olien))

溶媒系;

5. BuOH - ピリジン-酢酸-水 (5:8:0.1:
11) の上層

< アミノ酸分析 >

特記しない限り、試料は6N塩酸で110℃、
24~48時間封管中で加水分解した。

< PTH活性測定法 >

(1) PTHレセプターの調製

SD系塩ラット (体重200~250g) を断
頭、放血し、開腹の後、腎を摘出し、その表面皮
膜を取り除き、腎皮質部分を切り取り、氷冷する。
以下の操作はできるだけ低温 (0~4℃) 下で行
う。上記の腎皮質部分を0.25Mシクロロコースおよび1mMEDTA含有10mMトリス塩酸緩衝
液 (pH7.5) (以下A液と称す) 中に投し、テ
フロンベツスルを用いたガラス外套管で腎皮質を
その重量 (g) の8倍容量 (ml) のA液を加え
てホモゲナイズする。このホモジネートを150
Xg、10分間遠心分離し、その上清をさらに
2200Xg、15分間遠心分離し、上清を捨て、
沈降物の上層の浮濁色の部分をA液に懸濁し、こ
の懸濁液を200Xg、15分間遠心分離により
洗浄し、再び懸濁して容器に分注し、-70℃で
凍結して-20℃で保存する。

(2) PTHとPTHレセプターの反応

被検品のh-PTH (1-84) NH₂を2μg/
mlと10μg/mlの濃度になるようにA+TPMg
2mM、MgCl₂ 10mM、KCl 60mM、GTP 20μM、
インシュリンメチルキサンチン1mM、クレアチン
ホスファート8mMおよび牛血清アルブミン (B
SA) 0.2%含有100mMトリス塩酸緩衝液
(pH7.5) (以下B液と称す) に溶かし、これ
を標準品hPTH (1-84) についても行う。

これら4つの溶液を50 μ l づつガラス試験管に分注し、各々8本づつ用意する。試料は氷水中に保ち、ATPなど他の物質の分解を抑える。-20℃に保存したPTHレセプター調製品を室温で溶解し、A液に予め溶かしておいたクレアチンキナーゼを加え、さらにA液でクレアチンキナーゼ0.1 μ g/ μ l、PTHレセプター調製品蛋白量1.4 μ g/ μ l になるように調整し、氷冷中で保つ。上記の分注された試料溶液を37℃の恒温槽に数分間つけた後に、上記のPTHレセプター-クレアチンキナーゼ液を50 μ l づつ加え、37℃で10分間インキュベートする。次いで0.1M酢酸緩衝液(pH 4.0) 100 μ l を加え、直ちに氷水中につけた後、すみやかに試験管を沸騰水中で1分間加熱し、反応を停止させる。

(3) 生成C-AMPの測定

上記の反応停止試料を蒸留水で10~30倍に希釈し、2000 X G、15分間の遠心分離により除蛋白を行う。その上清のC-AMP量をR1Aキット(ヤマサ醤油社製)で測定する。

- 19 -

攪拌を続けた。15分後、濃アンモニア水20.9 μ l を加え、食塩-氷の混合物で冷却しながら4時間攪拌した。析出した結晶を回収した。母液を減圧濃縮し、得られた結晶を先の結晶と合せて5%アンモニア水で3回、水で3回洗浄した後、ジオキサン-メタノール-酢酸エチルで再結晶化した(1)を得た。収量2.8.186 g (収率85.8%)

融点; 180~182℃

TLC; R_f = 0.74

(α)_D²⁰ = -17.89°(c=0.92, DMF)

元素分析(C₁₆H₁₈N₂O₄として)

	C %	H %	N %
計算値	65.84	6.14	8.53
測定値	65.76	6.28	8.44

2) F(88-84); Z(OMe)-Asn-Phe-NH₂ (2)

(1) 5.878 g にアニソール3.89 μ l、TPA 15.56 μ l を加え、0℃で1時間攪拌した後、TPAを室温で減圧下留去した。残渣をヘキサンで処理し、生じた沈澱物を傾斜法により分離した。

(4) PTH力価の測定

C-AMPの測定値をPM/mg PTHレセプター-蛋白/分の単位に換算し、これを反応の値とし、標準品によつて得られた値に対して被検品を平行線検定2×2点法を用いて検定する。

実施例 1

H-PTH(1-34)NH₂; H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Oly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-NH₂

1) F(34); Z(OMe)-Phe-NH₂ (1)
Z(OMe)-Phe-OH 2.984 g (0.1M) を THF 200 μ l に溶かし、これにEt₃N 15.29 μ l (0.11M) を加えた後、-20℃に冷却下攪拌しながらインプテルクロロホルム 14.45 μ l (0.11M) を滴下した。結晶が析出し、攪拌が困難となつたので、THF 200 μ l を追加し、

- 20 -

得られたH-Phe-NH₂・TFAをDMF 60 μ l、Et₃N 2.51 μ l を加え、次いでZ(OMe)-Asn-ONp 7.471 g (17.9mM)、Et₃N 2.51 μ l を加え、室温で20時間攪拌した。反応液を冷却下少量の酢酸で中和した後、減圧濃縮した。残渣に5%クエン酸水、酢酸エチルを加えて結晶化し、5%クエン酸水、5%重曹水、水の順で結晶を洗浄した後、DMSO-メタノールで再結晶化した(2)を得た。収量6.01 g (収率75.9%)

融点; 243~245℃

(α)_D²⁵ = -19.3°(c=0.9, DMSO)

TLC; R_f = 0.60, R_f = 0.15

元素分析(C₂₂H₂₈N₄O₈として)

	C %	H %	N %
計算値	59.72	5.92	12.66
測定値	59.43	5.93	12.63

3) F(31-84); Z(OMe)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (3)

(2) 6.00 g にアニソール4.48 μ l、TPA

17.72 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え生じた沈澱物を採取した。これにDMSO-DMF(1:1)50 ml、Et₃N1.90 mlを加え、H-Asn-Phe-NH₂の溶液を得た。

一方、Z(OMe)-Val-His-NHNH₂ 7.049 gをDMF 80 mlに溶かし、これに-50℃に冷却下8.809 N-HCℓ/DMF溶液15.41 ml、次いで亜硝酸イソamil 2.61 mlを加えた。-20℃で20分間攪拌後、再度-50℃に冷却下Et₃N2.51 mlを加え、これに上記のH-Asn-Phe-NH₂の溶液を加え、4℃で18時間攪拌した。反応後、溶媒を減圧下留去し、残渣に8%酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈澱物を採取した後、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMSO-MeOHで再結晶化して〔8〕を得た。収量6.216 g(収率64.8%)
融点; 204 ~ 207℃
(α)_D²⁵ -13.9°(C=1.1, DMSO)

- 23 -

融点; 286~278℃

(α)_D²⁵ -16.3°(C=1.0, DMSO)

TLC; R_{f2} = 0.39

アミノ酸分析; Asp 2.01 (2)、Val 1.00 (1)、Phe 1.00 (1)、His 0.91 (1)

元素分析(C₂₄H₃₃N₅O₁₁として)

	C %	H %	N %
計算値	59.78	6.04	14.26
測定値	60.06	6.25	14.37

- 5) F(29-34); Z(OMe)-Glu-Asp(Obzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (5)
〔4〕5.00 g (5.66 mM) にアミソール 3.08 ml、TFA 12.32 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを減圧下留去した。残渣にエーテルを加え、析出した沈澱物を採取、乾燥した。これにDMF 50 ml、Z(OMe)-Glu-ONp 2.92 g、Et₃N 2.53 mlを加え、室温で48時間攪拌した。反応液を冷却下数滴の酢酸で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に8%酢酸水、酢酸エチルを加え、析出した粉末を採取した後、8

TLC; R_{f2} = 0.30

アミノ酸分析; Val 1.02 (1)、His 0.95 (1)、Asp 0.98 (1)、Phe 1.00 (1)

元素分析(C₃₃H₄₂N₈O₈ · 1 1/2 H₂Oとして)

	C %	H %	N %
計算値	56.16	6.43	15.88
測定値	55.90	6.14	15.70

- 4) F(80-84); Z(OMe)-Asp(Obzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (4)
〔3〕6.00 g にアミソール 2.88 ml、TFA 11.52 mlを加え、0℃で60分間攪拌した後、TFAを室温で減圧下留去した。残渣にエーテルを加え、析出した結晶を採取、乾燥した後、DMF 50 ml、Et₃N 2.46 ml、Z(OMe)-Asp(Obzl)-ONp 5.389 g、Et₃N 1.23 mlを加え、室温で18時間攪拌した。反応後、DMFを減圧下留去し、残渣に8%酢酸水、酢酸エチルを加えた。得られた粉末を8%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄後、DMF-メタノールから8回結晶化して〔4〕を得た。収量6.00 g(収率76.8%)

- 24 -

8%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-メタノールで2回再沈澱して〔5〕を得た。収量5.111 g(収率90.3%)

融点; 284 ~ 288℃

(α)_D²⁵ -22.6°(C=1.1, DMSO)

TLC; R_{f3} = 0.31

アミノ酸分析; Glu 1.06 (1)、Asp 2.06 (2)、Val 1.00 (1)、Phe 1.00 (1)、His 0.83 (1)

元素分析(C₄₉H₆₁N₁₁O₁₃ · H₂Oとして)

	C %	H %	N %
計算値	57.13	6.16	14.96
測定値	57.39	6.08	14.76

- 6) F(27-28) Z(OMe)-Lys(Z)-Leu-OMe (6)

H-Leu-OMe 2.91 gをDMF 50 mlに溶かし、0℃に冷却してEt₃N 2.24 mlでpH 7に調節後、Z(OMe)-Lys(Z)-OTCP 1.0 gをTHF 50 mlに溶解した溶液とEt₃N 2.24 mlを加えて室温で20時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルおよび5%クエン酸と共に

ふりませた。有機層を5%クエン酸、食塩水、5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加え結晶を得た。MeOH-エーテルから再結晶化して〔6〕7.33g(収率80.1%)を得た。

融点; 107~108℃

$[\alpha]_D^{20} = +21.2^\circ$ (C=0.9, MeOH)

TLC; $Rf_1 = 0.73$, $Rf_2 = 0.63$

元素分析 (C₃₀H₄₁O₃N₅として)

	C %	H %	N %
計算値	63.08	7.23	7.85
測定値	63.18	7.28	7.26

7) F(25-28) Z(OMe)-Lys(Z)-

Lys(Z)-Leu-OMe (7)

〔6〕5.72gにアニソール2.17ml, TFA

8.68mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣をn-ヘキサンで3度洗浄し乾燥した。これをDMF 20mlに溶解し、Et₃N 1.4mlでpH 7に調整後、Z(OMe)-Lys(Z)-OTCP 6.24g, Et₃N 1.4mlを加え室温で20

- 27 -

6.71gを酢酸エチル 20mlおよび1N塩酸8.64mlと共にふりませた。有機層を水20mlで洗浄後、減圧濃縮した。この残渣をTHF 20mlに溶かし、Et₃N 1.45mlを加え、-10℃で塩化インブチロキシンカルボニル 1.86mlを加え5分間攪拌した。これに上記の粉末をDMF 20mlに溶かし、Et₃N 1.00mlでpH 7に調整した溶液を加え、0℃で4時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に5%クエン酸、エーテルを加え生じた沈澱物を採取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルから再結晶化して〔8〕5.78g(収率68.5%)を得た。

融点; 151 ~ 152℃

$[\alpha]_D^{20} = -8.9^\circ$ (C=0.7, DMF)

TLC; $Rf_1 = 0.76$, $Rf_2 = 0.75$

元素分析 (C₃₅H₅₁O₁₁N₅Sとして)

	C %	H %	N %
計算値	60.44	6.96	10.75
測定値	60.48	6.97	10.65

9) F(25-28); Z(OMe)-Arg(Mis)-

時間攪拌した。反応後、DMFを減圧下留去し、残渣に5%クエン酸、エーテルを加え生じた沈澱物を採取した。この沈澱物を5%クエン酸、水、5%重曹水、水の順で洗浄した。MeOH-エーテルから再結晶化して〔7〕6.71g(収率80.5%)を得た。

融点; 153 ~ 154℃

$[\alpha]_D^{20} = -15.8^\circ$ (C=1.1, DMF)

TLC; $Rf_1 = 0.41$

元素分析 (C₄₄H₅₅O₁₁N₅として)

	C %	H %	N %
計算値	63.37	7.13	8.40
測定値	63.54	7.21	8.38

8) F(25-28) Z(OMe)-Arg(Mis)-

Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-OMe (8)

〔7〕6.00gにアニソール2.33ml, TFA

9.33mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈澱物を採取し、乾燥して粉末を得た。

一方、Z(OMe)-Arg(Mis)-OH-CHA

- 28 -

Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-NHNH₂ (9)

〔8〕5.78gをMeOH 50mlに溶解し、これにヒドラジン水和物 1.23mlを加え室温で一夜放置した。析出した結晶を採取し、EtOHで洗浄した。MeOH-EtOHから再結晶化して〔9〕5.25g(収率91.3%)を得た。

融点; 178~180℃

$[\alpha]_D^{20} = -10.1^\circ$ (C=0.7, DMF)

TLC; $Rf_1 = 0.48$

アミノ酸分析; Leu 1.01 (1), Lys 1.94 (2), Arg 1.01 (1)

元素分析 (C₅₅H₈₁O₁₃N₇Sとして)

	C %	H %	N %
計算値	59.42	6.96	13.14
測定値	59.29	7.17	12.87

10) F(25-34); Z(OMe)-Arg(Mis)-Lys(Z)-Lys(Z)-Leu-Gln-Asp(

OBzl)-Val-His-Asn-Phe-NH₂ (10)

〔5〕5.777gにアニソール 3.10ml, TFA

12.40mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TFA

- 29 -

- 30 -

を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を回収し、乾燥して粉末を得た。これにDMF 30 ml、Et₃N 1.59 mlを加え、中和溶液を得た。

[9]	8.0308g
DMF	20ml
3.936N-HCl/DMF溶液	4.18ml
亜硝酸イソアミル	1.07ml
Et ₃ N	8.44ml

上記試薬を用いて前項8)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で18時間攪拌した。反応液のニンヒドリン反応は陰性であったが、さらに

[9]	2.00g
DMF	10ml
3.936N-HCl/DMF溶液	1.04ml
亜硝酸イソアミル	0.27ml
Et ₃ N	0.86ml

の試薬を用いて調製したアジド溶液を追加し、18時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸数滴で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に8%酢酸水、酢

酸エーテルを加え、生じた沈殿物を回収し、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-SO-MeOHで3回再沈殿化して(10)を得た。収量9.171g (収率80.8%)。

融点; 226~230℃

(α)_D²⁵; -17.8° (C=1.0, DMSO)

TLIC; R_{f2} = 0.40

アミノ酸分析; Leu 0.97 (1)、Lys 2.02 (1)、Arg 1.19 (1)、Asp 1.96 (2)、Glu 0.98 (1)、Val 0.97 (1)、Phe 1.00 (1)、His 0.79 (1)

11) F (28-24) Boc-Trp-Leu-OH.

DCHA (11)

Boc-Trp-ONp 10.65gをDMF 30 mlに溶解した。これに0℃で、H-Leu-OH 8.9gを水10 ml、DMF 30 mlおよびEt₃N 6.95 mlに溶かして加え、室温で一夜攪拌した。溶液を減圧下留去し、残渣を5%重曹水、酢酸エーテルと共にふりまぜた。水層をクエン酸で酸性にし、酢酸エーテルを加えてふりまぜた。有機層を5%クエン

- 81 -

- 32 -

酸、水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をMeOHに溶かし、DCHA 5.45gを加える。MeOHを減圧下留去して、エーテルを加え結晶化した。MeOH-エーテルから再結晶化して(11)を得た。収量10.15g (収率97.0%)。

融点; 192~195℃

(α)_D²⁰; -22.9° (C=0.6, MeOH)

TLIC; R_{f2} = 0.67、R_{f3} = 0.69

元素分析 (C₂₂H₃₁O₅N₃ · C₁₂H₂₃Nとして)

	C %	H %	N %
計算値	68.19	9.09	9.36
測定値	68.07	9.14	9.27

12) F (22-24) Boc-Glu(OBzl)-

Trp-Leu-OH · DCHA (12)

(11) 10.0gを酢酸エーテル50 ml、水50 mlに懸濁し、1N塩酸17.1 mlを0℃で加えた。析出した塩を除去した後、有機層を食塩水で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エーテルを減圧下留去して、油状物を得た。これに2%ク

D Tを含むアニソール5.57 mlとTFA 22.28 mlを加え、0℃で窒素ガス下、1時間攪拌した。TFAを減圧下留去し、n-ヘキサンで3度洗浄後、乾燥した。これをDMF 50 mlに溶かし、Boc-Glu(OBzl)-OSu 7.43g、Et₃N 4.79 mlを加え、4℃で16時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を5%アンモニア水で溶かし、エーテルで洗浄した。水層をクエン酸で酸性とし、生じた油状物を酢酸エーテルで抽出した。酢酸エーテル層を食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣をMeOHに溶かし、DCHA 2.8 mlを加え、MeOHを減圧濃縮し、エーテルを加えて結晶化した。MeOH-エーテルから8度再結晶化して(12)を得た。収量7.84g (収率57.0%)。

融点; 148~150℃

(α)_D²⁰; -23.1° (C=1.8, MeOH)

TLIC; R_{f2} = 0.53、R_{f3} = 0.71

アミノ酸分析; Trp 0.76 (1)、Glu 1.12 (1)

Leu 1 (1) [4M-MSA, 110℃, 48時間]

元素分析 (C₂₄H₄₄O₈N₄ · C₁₂H₂₂N₂として)

	C %	H %	N %
計算値	67.53	8.26	8.56
測定値	67.23	8.28	8.69

- 35 -

を得た。収量 5.013 g (収率 58.2%)

融点: 282°C (分解)

$[\alpha]_D^{25} = -10.4^\circ$ (C = 0.8, DMSO)

TLC: R_f = 0.43, R_f = 0

アミノ酸分析: Glu 1.99 (2), Leu 1.92 (2),
Asp 1.96 (2), Val 0.95 (1), Phe 1.00 (1),
Lys 2.12 (2), His 0.93 (1), Arg 0.98 (1)

元素分析 (C₁₂₅H₁₆₄N₂₄O₂₇Sとして)

	C %	H %	N %
計算値	60.47	6.77	13.76
測定値	60.88	6.78	13.88

[14] F (20-21)%; Z (OMe) -
Val - NHNHTrp [14]

Z (OMe) - Val - NHNHTrp 22.79 g にアニ
ソール 10.74 ml、TFA 42.96 ml を加え、0°C 1 時間
攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣を n-ヘ
キサンで 3 度洗浄し、乾燥して油状物を得た。

一方、Z (OMe) - Arg (Mto) - OH · CHA 30.0
g を酢酸エチル 150 ml、水 100 ml に懸濁し、1 N
塩酸 48.41 ml を 0°C で加えた。析出した塩を除去し

- 37 -

特開 58-96052(10)
13) F (22-34), Boc - Glu (OBzl) - Trp

- Leu - Arg (Mto) - Lys (Z) - Lys (Z) -
Leu - Glu - Asp (OBzl) - Val - His - Asn
- Phe - NH₂ [13]

[10] 20.0 g にアニソール 38.3 ml、TFA 15.32 ml
を加え、室温で冷却下 60 分間攪拌した。TFA
を減圧下留去し、残渣にエーテルを加え、生じた
沈殿物を回収した後、5% 重曹水、水の順で洗浄
し、乾燥して粉末を得た。

一方、[12] 4.319 g に DMF - HMPA - DMSO
(1:1:1) の混液 3.0 ml、N-メチルホルモリ
ン 0.70 ml を加えて攪拌した後、前記の粉末および HOBt
0.857 g を加えて溶解させた。これに DCC 1.308
g を加えて、4°C で 18 時間攪拌した。反応液は
ニヒドリン反応で陽性であったので、さらに D
CC 218 mg を加え、18 時間攪拌した。反応後、
冷却下酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残
渣に 3% 酢酸水、酢酸エチルを加え、生じた沈
殿物を回収し、3% 酢酸水、5% 重曹水、水の順で
洗浄した。DMF - MeOH で 4 回再沈殿化して [13]

- 36 -

した後、有機層を食塩水で洗浄し、無水硫酸ナ
トリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去して
油状物を得た。これを THF 100 ml に溶かし、Et₃N
81.3 ml を加え、-10°C で塩化インブチロキシカ
ルボニル 7.53 ml を加え 5 分間攪拌した。これに上
記の油状物を DMF 5.0 ml に溶かし、Et₃N 0.78 ml
で pH 7 に調整した溶液を加え、-10°C で 2 時
間、室温で 16 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮
し、残渣を酢酸エチルおよび 5% クエン酸と共に
ふりまぜた。有機層を 5% クエン酸、食塩水、1
% アンモニウム水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸
ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた油
状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶
出溶媒 CHCl₃ - MeOH (20:0.5)) により精製し
て [14] を得た。収率 29.25 g (収率 74.7%)

融点: 114 ~ 116°C

$[\alpha]_D^{20} = -2.46^\circ$ (C = 1.1, MeOH)

TLC: R_f = 0.62, R_f = 0.46

元素分析 (C₃₂H₄₄O₉N₇SO₃として)

- 38 -

	C %	H %	N %
計算値	47.50	5.48	12.12
測定値	47.24	5.43	11.88

15) P (19-21) Boc-Glu (OBzl)-Arg

(Mto)-Val-NHNHTrp [15]

[14] 730g にアニソール 389 ml、TFA 15.57

ml を加え、0℃ 1時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈殿物を採取し、乾燥して粉末を得た。これを DMF 50 ml に溶かし、Et₃N 126 ml で PH 7 に調整して、Boc-Glu (OBzl)-ONp 413 g と Et₃N 126 ml を加え、室温で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣に 5% クエン酸、エーテルを加え生じた沈殿物を採取した。5% クエン酸、水、5% 重曹水、水の順で洗浄し、MeOH-エーテルから再結晶化して [15] を得た。収量 6.29g (収率 72.5%)。

融点: 159~160℃

$[\alpha]_D^{20}$: -31.9° (C = 1.1, MeOH)

TLC: R_{f2} = 0.68, R_{f3} = 0.74

- 39 -

測定値 56.73 7.18 14.17

17) P (19-34): Boc-Glu (OBzl)-Arg

(Mto)-Val-Glu (OBzl)-Trp-Leu-

Arg (Mto)-Lys (Z)-Lys (Z)-Leu-

Gln-Asp (OBzl)-Val-His-Aon-

Ph-NH₂ [17]

[13] 480 g (1.96 mm) にアニソール (2% EDT を含む) 326 ml、TFA 128 ml を加え、0℃ で 60 分間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残渣にヘキサンを加え、生じた沈殿物を採取、乾燥して粉末を得た。これに DMF 30 ml、Et₃N 0.55 ml を加え、中和溶液を得た。

[16] 2.32 g

DMF 10 ml

3.936 N-HCl/DMP 溶液 1.79 ml

重碳酸イソアミル 0.47 ml

Et₃N 0.98 ml

N-メチルモルホリン 0.78 ml

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして得たアジド溶媒に上記の中和溶液を加え、4℃ で

元素分析 [C₄₀H₅₇O₁₁N₈SG₂として]

	C %	H %	N %
計算値	49.82	5.96	11.62
測定値	49.85	5.97	11.60

16) P (19-21); Boc-Glu (OBzl)-Arg (Mto)

- Val-NHNH₂ [16]

[15] 629 g を酢酸 1.5 ml に溶解し、亜鉛末 4.25 g を加え、室温で 8 時間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、残渣に 5% 重曹水を加え生じた沈殿物を採取した。飽和 EDTA 水溶液、水の順で洗浄した。MeOH-エーテルから再結晶化して [16] を得た。収量 2.64 g (収率 51.3%)。

融点: 186~187℃

$[\alpha]_D^{20}$: -5.6° (C = 0.7, DMP)

TLC: R_{f2} = 0.58, R_{f3} = 0.55

アミノ酸分析: Glu 1.20 (1), Leu 1 (1),

Arg 1.07 (1)

元素分析 [C₃₇H₅₆O₉N₈・½H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	55.69	7.20	14.04

- 40 -

48 時間攪拌した。反応後、冷却下酢酸で中和し、溶媒を減圧下留去した。残渣に 3% 酢酸水、酢酸エーテルを加え、生じた沈殿物を採取し、3% 酢酸水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エーテルで再沈殿化して粗生成物を得た。これを CHCl₃-MeOH-水 (8:3:1) 5 ml に溶かし、シリカゲル (2.3 × 50 cm) にチャージし、溶出溶媒 CHCl₃-MeOH-水 (8:3:1) を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製した。R_{f2} = 0.41 の溶出区分 (R_{f2} = 0.51 の区分は除く) を集め、減圧濃縮した。残渣に酢酸エーテルを加えて粉末化して [17] を得た。収量 4.07 g (収率 67%)。

融点: 255℃ (分解)

$[\alpha]_D^{25}$: -1.0° (C = 1.0, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.41, R_{f4} = 0.73

アミノ酸分析: Glu 3.06 (3), Arg (2), Val 1.87

(2), Asp 2.07 (2), Leu 2.03 (2), Phe 1.00 (1),

Lys 2.16 (2), His 0.99 (1)

元素分析 [C₁₅₅H₂₀₈N₃₀O₃₄・½H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	59.54	6.80	13.44
測定値	59.24	6.68	13.37

18) F (16-18); Boc - Aen - Ser - Met - OMe [18]

Chem. Pharm. Bull., 27 (2), 499-507 (1979)

に記載の方法で得た Z (OMe) - Ser - Met - OMe 18.651 g にアニソール 0.78 ml、TPA 39.12 ml を加え、0℃で60分間攪拌した後、TPA を減圧下留去した。残渣をヘキサンで洗浄後、エーテルを加え、生じたガム状の沈澱物を傾斜法により分離し、乾燥した。これに DMF 9.0 ml、Et₃N 630 ml を加えて攪拌した後、Boc - Aen - ONp 17.49 g、Et₃N 693 ml を加えて16時間攪拌した。反応後、DMF を減圧下留去し、得られた油状物に5%クエン酸含有飽和食塩水、酢酸エチルを加えてふりまぜた。酢酸エチル層を5%クエン酸水、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をエーテルで処理して結晶化し、メタノール-エーテルで再結晶化して[18]

- 43 -

元素分析 [C₁₇H₃₂N₆O₇S として]

	C %	H %	N %
計算値	48.95	6.94	18.09
測定値	48.86	7.02	17.87

20) F (16-34); Boc - Aen - Met - Glu (OBzl) - Arg (Mte) - Val - Glu (OBzl) - Trp - Leu - Arg (Mte) - Lys (Z) - Gln - Asp (OBzl) - Val - His - Aen - Phe - NH₂ [20]

[17] 500 mg (0.161 mmol) にアニソール (2% B.D.T 含有) 0.35 ml、TPA 1.40 ml を加え、0℃で60分間攪拌した後、TPA を減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた沈澱物を採取し、乾燥して粉末を得た。これに DMF 5 ml、Et₃N 452 μl を加えて、中和溶液を得た。

[19]	150.5 mg
DMF	0.20 ml
3.936 N-HCl 液/DMF 溶液	0.20 ml
亜硝酸イソアミル	51.7 μl
Et ₃ N	108.4 μl

を得た。収量 12.96 g (収率 62.0%)

融点: 133~135℃

$[\alpha]_D^{25} = -31.8^\circ$ (C = 0.9, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.51, R_{f3} = 0.24

元素分析 [C₁₈H₃₂N₄O₈S として]

	C %	H %	N %
計算値	46.54	6.94	12.06
測定値	46.77	6.89	11.98

19) F (16-18); Boc - Aen - Ser - Met - NHNH₂ [19]

[18] 400 g を MeOH 50 ml に溶かし、これにヒドラジン水和物 215 ml を加え、室温で18時間放置した。析出した結晶を EtOH で処理し、採取した後、EtOH で洗浄した。DMF-EtOH で再結晶して[19]を得た。収量 289.3 g (収率 72.4%)

融点: 212~216℃

$[\alpha]_D^{25} = -20.4^\circ$ (C = 1.0, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.32, R_{f3} = 0.10

アミノ酸分析: Ser 0.88 (1), Asp 1.00 (1), Met 0.40 (1)

- 44 -

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去し、残渣にエーテル、5%クエン酸水溶液を加え、生じた沈澱物を採取した。5%クエン酸水、5%重曹水、水で各々3回づつ洗浄し、DMF-酢酸エチルで5回再沈澱化して[20]を得た。収量 468.8 mg (収率 83.9%)

融点: 143~144℃

$[\alpha]_D^{25} = -2.7^\circ$ (C = 0.8, DMF)

TLC: R_{f2} = 0.57, R_{f4} = 0.79

アミノ酸分析: Asp 3.18 (3), Ser 0.90 (1),

Met 0.70 (1), Glu 2.98 (3), Val 1.92 (2),

Leu 2.01 (2), Phe 1.00 (1), Lys 2.14 (2), His

0.96 (1), Arg 2.12 (2)

元素分析 [C₁₆₇H₂₂₈N₃₄O₃₂S₃·4H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	57.24	6.79	18.59
測定値	57.34	6.59	18.47

21) F (14-15); Z (OMe) - His - Leu - OMe [21]

- 45 -

- 420 -

- 46 -

Z (OMe) - H1a - NHNH ₂	2.000 g
4.78 N-HCl 8/DMP 溶液	4.521 ml
亜硝酸イソアミル	9.58 ml
DMP	20 ml
Et ₃ N	4.032 ml

E
Z (OMe) - H1a - NHNH₂を前項3)の方法と

同様に得られたアジド溶液に、H-Lou-OMe・HCl 9.08 gをDMP 50 mlに溶かし、Et₃N 7.00 mlでPH 7に調整した溶液を加えた後、4℃で20時間攪拌した。DMPを減圧下留去し、残液を酢酸エチルおよび5%重曹水と共にふりまぜた。有機層を5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残液にエーテルを加えて結晶化し、MeOH-エーテルから再結晶化して〔21〕1632 g (収率 73.1%)を得た。

融点: 110 ~ 111℃

$[\alpha]_D^{20}$: -2.41° (C=1.1, MeOH)

TLI: Rf₂ = 0.65, Rf₃ = 0.17

元素分析 (C₂₂H₃₀O₆N₄として)

- 47 -

TLI: Rf₂ = 0.65

元素分析 (C₃₂H₄₈O₈N₆として)

	C %	H %	N %
計算値	59.61	7.50	18.04
測定値	59.61	7.45	18.03

23) P (13-15); Boc-Lys (Z) - H1a - Lou - NHNH₂ [23]

〔22〕265 gをMeOH 20 mlに溶解し、ヒドラジン水和物 103 mlを加え、室温で2日間放置した。MeOHを減圧下留去し、残液に水を加えた後、生じた沈殿物をろ取した。MeOH-酢酸エチルから再結晶化して〔23〕210 g (収率 79.3%)を得た。

融点: 167 ~ 169℃

$[\alpha]_D^{20}$: -2.14° (C=1.0, DMP)

TLI: Rf₂ = 0.48

アミノ酸分析: Lou 1 (1), Lys 0.97 (1),

H1a 0.91 (1)

元素分析 (C₃₁H₄₈O₉N₈として)

	C %	H %	N %
計算値	57.74	7.50	17.38

	C %	H %	N %
計算値	59.18	6.77	12.55
測定値	58.93	6.70	12.32

22) P (13-15); Boc-Lys (Z) - H1a - Lou - OMe [22]

〔21〕511 gにアニソール 249 ml、TPA 996 mlを加え、0℃で1時間攪拌した。TPAを減圧下留去し、残液にエーテルを加えた後、生じた沈殿物をろ取し、乾燥した。得られた粉末をDMP 20 mlに溶かし、Et₃N 319 mlを加えPH 7に調整後、Boc-Lys (Z) - OSuを加えて、室温で20時間攪拌した。DMPを減圧下留去し、残液を酢酸エチルおよび5%重曹水と共にふりまぜた。有機層を5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを減圧下留去し、残液にエーテルを加えて結晶化し、MeOH-エーテルから再結晶化して〔22〕542 g (収率 73.7%)を得た。

融点: 144 ~ 147℃

$[\alpha]_D^{20}$: -33.6° (C=0.7, MeOH)

- 48 -

測定値	57.58	7.52	17.38
-----	-------	------	-------

24) P (13-34); Boc-Lys (Z) - H1a - Lou - Aen - Ser - Met - Glu (OEt) - Arg (Me) - Val - Glu (OEt) - Trp - Lou - Arg (Me) - Lys (Z) - Lys (Z) - Lou - Gln - Asp (OEt) - Val - H1a - Aen - Phe - NH₂ [24]

〔20〕435 mg (0.127 mM)にアニソール (2% B.D.T含有) 0.41 ml、TPA 1.64 mlを加え、0℃で90分間攪拌した後、TPAを減圧下留去した。残液にヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した後、エーテルを加えた。生じた沈殿物をろ取し、乾燥して粉末を得た。これにDMP 5 ml、Et₃N 35 μlを加え、中和精液を得た。

〔23〕 163.8 mg

DMP	3 ml
3.936 N-HCl 8/DMP 溶液	232 μl
亜硝酸イソアミル	41 μl
Et ₃ N	85 μl

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして

- 49 -

- 50 -

得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で60時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMFを減圧下留去した。残渣に冷却下3%酢酸水、エーテルを加え、生じた沈物をろ取した後、3%酢酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エーテルで5回再結晶化して〔24〕を得た。収量482.3g(収率96.1%)

融点: 118~120℃

$[\alpha]_D^{25} = -2.7^\circ$ (C=1.1, DMF)

TLC: R_{F2} = 0.38, R_{F4} = 0.75

アミノ酸分析: Lys 312(3)、Lys 318(3)、His 218(2)、Asp 310(3)、Ser 0.79(1)、Glu 299(3)、Val 196(2)、Met 0.48(1)、Phe 1.00(1)、Arg 199(2)

元素分析 [C₁₉₃H₂₆₄N₄₀O₄₄S_{3.6}H₂Oとして]

	C%	H%	N%
計算値	57.20	6.86	13.83
測定値	57.07	6.58	13.67

28) P(11-12); Z(OMe)-Leu-Gly-OMe〔25〕

- 51 -

53.04 mlを加え、0℃1時間攪拌した。TPAを減圧下留去し、残渣をn-ヘキサンで3度洗浄後、乾燥した。これをDMF 100 mlに溶解し、Et₃N 8.54 mlでPH 7に調節した後、Z(OMe)-Aen-ONp 25.46 g、Et₃N 8.54 mlを加え、室温で20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣に5%クエン酸、酢酸エーテルを加えた後、生じた沈物をろ取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エーテルから再結晶化して〔26〕224.2 g(収率76.5%)を得る。

融点: 196~197℃

$[\alpha]_D^{25} = -15.4^\circ$ (C=0.8, DMF)

TLC: R_{F2} = 0.56, R_{F3} = 0.33

元素分析 [C₂₂H₃₂O₈N₄として]

	C%	H%	N%
計算値	54.99	6.71	11.66
測定値	55.14	6.86	11.60

27) P(9-12); Z(OMe)-His-Aen

-Leu-Gly-OMe〔27〕

〔26〕14.03 gにアニソール0.52 ml、TPA

11-Gly-OMe-HCB 12.56 gをDMF 50 mlに溶解し、Et₃N 1.4 mlでPH 7に調節した後、Z(OMe)-Leu-ONp 41.64 g、Et₃N 1.4 mlを加えて、室温で18時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣を酢酸エーテルに溶解した。5%クエン酸、5%重曹水、食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残渣にエーテルを加えて結晶化した後、酢酸エーテル-エーテルから再結晶化して〔25〕28.98 g(収率79.1%)を得た。

融点: 78~79℃

$[\alpha]_D^{25} = 1.31^\circ$ (C=0.7, DMF)

TLC: R_{F2} = 0.71

元素分析 [C₁₈H₂₆O₆N₂として]

	C%	H%	N%
計算値	59.00	7.15	7.65
測定値	59.17	7.16	7.59

26) P(10-12); Z(OMe)-Aen-Leu-Gly-OMe〔26〕

〔25〕223.6 gにアニソール13.26 ml、TPA

- 52 -

38.08 mlを加え、0℃1時間攪拌した。TPAを減圧下留去し、残渣にエーテルを加えた後、生じた沈物をろ取し、乾燥して粉末を得た。

Z(OMe)-His-NHNH ₂	11.67 g
5.55 N-HCB/DMF溶液	22.70 ml
亜硝酸イソamil	5.59 ml
DMF	20 ml
Et ₃ N	22.54 ml

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得られたアジド溶液に、上記で得た粉末をDMF 70 mlに溶解し、Et₃N 4.09 mlでPH 7に調節した溶液を加えた。4℃で20時間攪拌した。DMFを減圧下留去し、残渣に5%重曹水、エーテルを加えた後、生じた沈物をろ取した。5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-MeOHから再結晶化して〔27〕15.13 g(収率83.9%)を得た。

融点: 226~227℃

$[\alpha]_D^{25} = -11.1^\circ$ (C=0.8, DMF)

TLC: R_{F2} = 0.37

元素分析 [C₂₈H₃₂O₉N₄として]

	C %	H %	N %
計算値	54.45	6.36	15.88
測定値	54.31	6.38	15.73

28) F (8-12); Boc-Met-His-Aun-Leu
-Gly-OMe [28]

[27] 508 g にアニソール 4.0 ml、TFA 120 ml を加え、0℃1時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、エーテルを加えた後、生じた沈澱物をろ取し、乾燥して粉末を得た。これに DMF 5.0 ml、Et₃N 228 ml を加えて攪拌した後、Boc-Met-OSu 285 g、Et₃N 114 ml を加え、24時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残液をブタノールに溶かし、水で4回洗浄した後、減圧濃縮した。残液にエーテルを加え、生じたゲル状粉末をろ取し、MeOH-EtOH で2回再結晶化して [28] を得た。収量 257 g (収率 45.7%)。

融点: 122 ~ 125℃

$[\alpha]_D^{25} = -2.67^\circ$ (C = 0.7, DMF)

TLG; Rf₂ = 0.59

- 55 -

Glu (OBzl) - Trp - Leu - Arg (Mts) -
Lys (Z) - Lys (Z) - Leu - Gln - Asp (OBzl)
- Val - His - Aun - Phe - NH₂ [30]

[24] 482.3 mg (0.122 mmol) にアニソール (2% Et₂O 含有) 0.46 ml、TFA 1.84 ml を加え、0℃で90分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残液をヘキサンで洗浄した後、エーテルを加え、生じた沈澱物をろ取、乾燥した。得られた粉末に DMF 5 ml、Et₃N 510 μl を加え、中和溶液を得た。

[29]	1671 mg
DMF	3 ml
3.936 N-HCl/DMP 溶液	22.33 μl
亜硝酸イソamil	39.0 μl
Et ₃ N	163.3 μl

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残液に5%クエン酸水、エーテルを加え、生じた沈澱物をろ取し、5%ク

29) F (8-12); Boc-Met-His-Aun-Leu
-Gly-NHNH₂ [29]

[28] 827 g を DMF-MeOH (4:1) 30 ml に溶かし、これにヒドラジン水和物 120 ml を加え、室温で18時間放置した。溶液を減圧下留去し、残液にEtOHで処理して結晶化させ、ろ取した後、MeOH-EtOHで2回再結晶化して [29] を得た。収量 298 g (収率 90.9%)。

融点: 184 ~ 186℃

$[\alpha]_D^{25} = -3.31^\circ$ (C = 0.9, DMF)

TLG; Rf₂ = 0.31

アミノ酸分析: Asp 0.95 (1), Gly 1.01 (1),
Met 0.92 (1), Leu 1.00 (1), His 0.95 (2)

元素分析 [C₂₈H₄₈N₁₀O₈ S として]

	C %	H %	N %
計算値	49.11	7.07	20.46
測定値	49.04	7.14	20.23

30) F (8-34); Boc-Met-His-Aun-Leu
-Gly-Lys (Z)-His-Leu-Aun-Ser
-Met-Gln (OBzl)-Arg (Mts)-Val-

- 56 -

エン酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エチルで5回再沈澱化して粗製の [30] を得た。これを DMF 10 ml に溶かし、セファデックス LH-60 (8.3 × 140 cm) にチャージし、DMF で溶出した。各フラクションは9mlずつ分画し、43 ~ 55番目のフラクションを集めて減圧乾固した。残液を酢酸エチルで処理して粉末化して [30] を得た。収量 360.9 mg (収率 6.7%)。

融点: 135 ~ 137℃

$[\alpha]_D^{25} = -4.7^\circ$ (C = 0.6, DMF)

TLG; Rf₂ = 0.34, Rf₄ = 0.69

アミノ酸分析: Asp 4.27 (4), Gly 1.23 (1),
Met 1.61 (2), Leu 4.36 (4), His 8.06 (3),
Ser 0.81 (1), Glu 8.03 (3), Val 2.00 (2),
Phe 1.00 (1), Lys 8.15 (3), Arg 2.00 (2)

元素分析 [C₂₁H₃₀N₄O₅S₄·5H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	56.55	6.81	14.66
測定値	56.32	6.66	14.77

31) F (6-7); (OMe)-Gln-Leu-NHNH

Z (OMe) - Leu - NHNH Troc 2.00 g にアニソール 8.96 ml、TFA 35.84 ml を加え、0℃1時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残液を n-ヘキサンで洗浄し、乾燥した。これを DMF 120 ml に溶解し、Et₃N 11.52 ml、Z (OMe) - Glu - ONp を加え、室温で18時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残液に5%クエン酸、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物をろ取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エチルから再結晶化して [31] 2.070 g (収率 20%) を得る。

融点: 188~190℃

$[\alpha]_D^{20}$: -1.71° (C = 1.0, DMF)

TLG: Rf2 = 0.65, Rf3 = 0.44

元素分析 [C₂₃H₃₂O₈N₅O₁₃として]

	C %	H %	N %
計算値	45.07	5.26	11.43
測定値	45.52	5.41	11.52

32) P (5-7); Z (OMe) - Ile - Glu - Leu - NHNH

- 59 -

[32] 15.0 g にアニソール 8.99 ml、TFA 35.69 ml を加え、0℃1時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残液にエーテルを加えた後、生じた沈殿物をろ取し、乾燥した。これを DMF 50 ml に溶解し、Et₃N 5.80 ml、Boc - Glu (OBzl) - OSu 8.99 g を加え、室温で20時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残液に5%クエン酸、エーテルを加えた後、生じた沈殿物をろ取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-MeOH から再結晶化して 15.89 g (収率 87.1%) を得た。

融点: 223~225℃

$[\alpha]_D^{18}$: -26.3° (C = 0.6, DMSO)

TLG: Rf2 = 0.59, Rf3 = 0.49

元素分析 [C₃₇H₅₆O₁₁N₇O₁₃として]

	C %	H %	N %
計算値	50.43	6.41	11.13
測定値	50.33	6.52	11.63

34) P (4-7); Boc - Glu (OBzl) - Ile - Glu

- Leu - NHNH₂ [34]

[31] 2.070 g にアニソール 11.00 ml、TFA 44.0 ml を加え、0℃1時間攪拌した。TFA を減圧下留去し、残液を n-ヘキサンで3度洗浄した後、乾燥した。これを DMF 200 ml に溶解し、Et₃N 9.48 ml、Z (OMe) - Ile - ONp 14.09 g を加え、室温で18時間攪拌した。DMF を減圧下留去し、残液に5%クエン酸、酢酸エチルを加えた後、生じた沈殿物をろ取した。5%クエン酸、5%重曹水、水の順で洗浄し、DMF-酢酸エチルから再結晶化して 1.743 g (収率 79.1%) を得た。

融点: 205~207℃

$[\alpha]_D^{20}$: -15.3° (C = 0.9, DMF)

TLG: Rf2 = 0.62, Rf3 = 0.32

元素分析 [C₂₀H₄₃O₉N₆O₁₃として]

	C %	H %	N %
計算値	47.97	5.97	11.58
測定値	48.16	6.17	11.66

33) P (4-7); Boc - Glu (OBzl) - Ile - Glu - Leu - NHNH Troc [33]

- 60 -

[33] 9.0 g を DMF 40 ml に溶かし、酢酸 6.81 ml、亜鉛末 6.67 g を加え、室温で18時間攪拌した。亜鉛末をろ去後、母液を減圧濃縮し、残液に飽和 EDTA 溶液を加えた後、重曹を加えて pH 7 に調節すると沈殿物が生じた。この沈殿物を飽和 EDTA 溶液、水の順で洗浄し、DMF-MeOH から2度再結晶化して [34] 5.31 g (収率 73.7%) を得た。

融点: 260℃以上で分解

$[\alpha]_D^{18}$: -22.3° (C = 0.6, DMSO)

TLG: Rf2 = 0.84

アミノ酸分析^a: Glu 2.06 (2), Ile 1.01 (1)

Leu 1 (1)

元素分析 [C₃₄H₅₅O₉N₇として]

	C %	H %	N %
計算値	52.85	7.85	18.89
測定値	52.76	8.00	18.64

35) P (4-34); Boc - Glu (OBzl) - Ile -

Glu - Leu - Met - His - Asn - Leu - Gly

- Lys (Z) - His - Leu - Asn - Ser - Met

— Glu (OBzl) — Arg (Mtn) — Val — Glu
(OBzl) — Trp — Leu — Arg (Mtn) — Lys(Z)
— Lys (Z) — Leu — Gln — Asp (OBzl) —
Val — Hiu — Ann — Phg — NH₂ [35]

[30] 357.1 mg (0.0794 mmol) にアニソール 0.35 ml、TFA 1.4 ml を加え、0℃で90分間攪拌した後、TFA を減圧下留去した。残渣にヘキサンを加え、生じた油状物を傾斜法により分離した後、エーテルを加え、生じた沈殿物を採取、乾燥して粉末を得た。これにDMF 5 ml、Et₃N 44.3 μl を加えて中和溶液を得た。

[34]	112.1 mg
DMF	1 ml
3.936 N-HCl/Et ₃ N 溶液	9.68 μl
亜硝酸イソアミル	2.53 μl
Et ₃ N	7.97 μl

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、DMF を減圧下留去した。残渣に5%クエン酸水、

エーテルを加え、生じた沈殿物を採取し、5%クエン酸水、5%重曹水、水の順で洗浄した。DMF-酢酸エーテルで2回再沈殿化して粗製の[35]を得た。これをDMF 5 ml に溶かし、セフアデックスLiH-GOのカラム(3.3×140 cm)にチャージし、DMF で溶出した。各フラクションは9 ml ずつ分画し、54～61番目のフラクションを集めて減圧乾燥した。残渣を酢酸エーテルで処理して粉末化して[35]を得た。収量 24.03 mg (収率59.7%)

融点: 138～141℃

$[\alpha]_D^{20} = -4.0^\circ$ (C = 0.5, DMF)

TLG; R_{f2} = 0.43, R_{f4} = 0.77

アミノ酸分析: Glu 493 (5), Ile 107 (1), Leu 541 (5), Asp 424 (4), Ser 083 (1), Gly 122 (1), Val 204 (2), Met 175 (2), Phe 100 (1), Lys 300 (3), His 292 (3), Arg 194 (2)

元素分析 [C₂₄H₃₄N₁₀O₁₇S₄·7H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	56.62	6.92	14.28

— 63 —

測定値 56.47 6.91 14.29
36) F (2-3); Z (OMe) — Val — Ser — OMe [36]
H — Ser — OMe 15.56 g をDMF 80 ml に溶かし、Et₃N 140 ml でpH 7 に調整した。この溶液にZ (OMe) — Val — OH 28.13 g をTHF 140 ml に溶かした溶液を加えた後、-10℃でDCC 24.76 g を加え3時間、室温で15時間攪拌した。沈殿物を除去後、溶液を減圧留去し、析出した結晶をEtOH で採取した。THF-EtOH から再結晶化して[36] 22.19 g (収率58.0%)を得た。

融点: 160～161℃

$[\alpha]_D^{20} = 9.9^\circ$ (C = 0.9, DMF)

TLG; R_{f2} = 0.63, R_{f3} = 0.64

元素分析 [C₁₈H₂₆O₇N₂ として]

	C %	H %	N %
計算値	58.53	6.85	7.33
測定値	56.70	6.96	7.36

37) F (1-3); Z — Ser — Val — Ser — OMe [37]

[36] 7.15 g にアニソール 40.6 ml、TFA 10.24 ml を加え、0℃で1時間攪拌した。TFA を

減圧留去し、残渣をn-ヘキサンで3度洗浄した後、乾燥して油状物を得た。これをDMF 3.5 ml に溶かし、Et₃N 2.62 ml を加えて中和溶液を得た。

Z — Ser — NHNH ₂	5.68 g
5.55 N-HCl/DMF 溶液	9.70 ml
亜硝酸イソアミル	3.58 ml
DMF	10 ml
Et ₃ N	11.31 ml

上記試薬を用いて前項3)の方法と同様にして得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で48時間攪拌した。沈殿物を除去し、母液を減圧濃縮した後、残渣にEtOHを加えた。生じた沈殿物を採取し、DMF-MeOH から再結晶化して[37] 4.94 g (収率60.1%)を得た。

融点: 211～213℃

$[\alpha]_D^{20} = 6.4^\circ$ (C = 0.9, DMF)

TLG; R_{f2} = 0.66

元素分析 [C₂₀H₂₉O₈N₃ として]

	C %	H %	N %
計算値	54.66	6.65	9.56

測定値 5.475 6.52 9.45
 38) P (1-3); % - Ser - Val - Ser - NHNH₂
 [38]
 [37] 327 mg を D M F 2.0 ml、MeOH 1.0 ml に
 溶解し、ヒドラジン水和物 186 mg を加えて一夜放置
 した。析出した結晶を MeOH で取り、EtOH で洗
 浄後、D M S O - MeOH から再結晶化して [38]
 2.65 g (収率 81.3%) を得た。

融点: 240℃

[α]_D²²: -3.4° (C = 0.6, D M S O)

T L C: R_f 2 = 0.44

アミノ酸分析: Ser 1.83 (2)、Val 1 (1)

元素分析 [C₁₉H₂₉O₈N₅ として]

	C %	H %	N %
計算値	51.92	6.65	15.94
測定値	51.63	6.65	15.98

39) P (1-34); Z - Ser - Val - Ser - Glu
 (OBzl) - Ile - Gln - Leu - Met - His -
 Asn - Leu - Gly - Lys (Z) - His - Leu -
 Asn - Ser - Met - Glu (OBzl) - Arg (Mte)
 - Val - Glu (OBzl) - Trp - Leu - Arg

- 67 -

酢酸エチルで 5 回再沈殿化して粗製の [39] 1998
 mg を得た。これを D M F 1.0 ml に溶かし、セフア
 クリル S - 200 のカラム (3.4 × 140 cm) にチャ
 ージし、D M F - 水 (9.5 : 5) の混液で溶出した。
 各フラクションを 1.0 ml づつ分画した。各フラク
 ションは 280 nm で追跡し、75 ~ 89 番目のフラ
 クションを集め、減圧乾燥した。残渣を酢酸エチ
 ルで処理して粉末 1413 mg を得た。これを D M F
 5 ml に溶かし、上記と同一条件でカラムクロマト
 グラフィーを行った。76 ~ 88 番目のフラクシ
 ョンを集め、減圧乾燥した。残渣を酢酸エチルで
 処理して精製した [39] を得た。収量 1113 mg

融点: 145 ~ 148℃

[α]_D²⁵: -3.5° (C = 0.3, D M F)

T L C: R_f 2 = 0.60, R_f 4 = 0.81

アミノ酸分析: Ser 2.78 (3)、Val 3.18 (3)、
 Asp 4.21 (4)、Glu 5.10 (5)、Gly 1.08 (1)、
 Met 1.49 (2)、Ile 1.07 (1)、Leu 5.18 (5)、
 Phe 1.00 (1)、Lys 2.91 (3)、His 2.45 (3)、
 Arg 1.91 (2)

- 69 -

(Mte) - Lys (Z) - Lys (Z) - Leu - Gln -
 Asp (OBzl) - Val - His - Asn - Phe - NH₂
 [39]

[38] 240.3 mg (0.0474 mmol) にアニソール (2
 % E D F 含有)、T P A 0.84 ml を加え、0℃で 90
 分間攪拌した後、T P A を減圧下留去した。残渣
 をヘキサンで洗浄し、エーテルを加え、生じた沈
 降物を採取、乾燥して粉末を得た。これに D M F
 5 ml、Et₃N 20.4 μl を加えて中和溶液を得た。

[38]	41.7 mg
D M F	1 ml
3.936 N - HCl / D M F 溶液	57.8 μl
亜硝酸イソアミル	15.1 μl
Et ₃ N	47.6 μl

上記試薬を用いて前項 3) の方法と同様にして
 得たアジド溶液に上記の中和溶液を加え、4℃で
 48 時間攪拌した。反応液を冷却下酢酸で中和し、
 D M F を減圧下留去した。残渣に 3% 酢酸水、エ
 ーテルを加え、生じた沈降物を採取し、3% 酢酸
 水、5% 重曹水、水の順で洗浄した。D M F - 酢

- 68 -

アミノ酸分析 [4 M - M S A, 110℃, 48 時間]
 ; Glu 5.13 (5)、Ile 1.02 (1)、Leu 5.36 (5)、
 Asp 4.40 (4)、Ser 0.94 (3)、Gly 1.22 (1)、Val
 1.90 (3)、Met 1.78 (2)、Phe 1.00 (1)、Trp 0.59
 (1)、Lys 2.96 (3)、His 2.92 (3)、Arg 1.91 (2)

元素分析 [C₂₅₅H₃₅₀N₅₅O₆₂S₄·7H₂O として]

	C %	H %	N %
計算値	56.51	6.85	14.24
測定値	56.55	6.81	13.98

40) h - P T H (1-34) NH₂

[39] 200 mg (0.0372 mmol) に m - クレゾール 0.78
 ml を加え、次いで 1 M - T P M S A と 1 M チオア
 ニソール含有 T P A 溶液 7.44 ml を加え、0℃で 2 時
 間攪拌した後、ヘキサンを加え、生じた油状物を
 傾斜法により分離した。エーテルを加えて粉末化
 し、すばやく採取、乾燥した。得られた粉末を冷
 却下水 1.0 ml に溶かし、これにアンバーライト G
 G - 4 B 樹脂 (アセタート型) 約 2 g を加え、30
 分間攪拌した。樹脂を濾去後、母液を氷水浴下 5 N
 アンモニア水で P H を 10.0 に調整した。再び酢酸

- 70 -

酸性とした後、凍結乾燥して粗生物を得た。TLC (Rf5 = 0.48 (ニンヒドリン反応))、Rf5 = 0.5 (エールリッヒ反応) を得た。これを1 N 酢酸水5 ml に溶かし、セファデックスG-50のカラム(2.8 × 143 cm) にチャージし、1 N 酢酸水でグルコースを洗脱した。溶出液は10 ml ずつ分画し、280 nm で追跡した。36 ~ 57 番目のフラクションP-1と58 ~ 72 番目のフラクションP-2を凍結乾燥して粉末P-1 31.8 mg (収率18.3%) および粉末P-2 140.1 mg (収率80.8%) を得た。

P-2 140 mg を8 M 尿素含有0.01 M 酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1) 5 ml に溶かし、これを予め0.01 M 酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1) で平衡化したGM-セルロースのカラム (2.4 × 5 cm) にチャージした。0.01 M 酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1) 40 ml で洗浄し、0.01 M 酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1) 300 ml と0.3 M 酢酸アンモニウム水溶液 (PH 5.1) 300 ml の間で直線濃度勾配をかけて溶出した。溶出液を5 ml ずつ分画し、各フラクションを280 nm で追跡し

- 71 -

溶出液は10 ml ずつ分画し、各フラクションを280 nm で追跡し、27 ~ 38 番目のフラクションを集めて凍結乾燥して白色粉38.6 mg (収率22.3%) を得た。この粉末をブタノール-ピリジン-酢酸 (0.6 M 酢酸アンモニウム水溶液 (5:0.1:1)) の上層液2 ml に溶かし、セファデックスG-50のカラム (2.4 × 94 cm) にチャージし、上記上層液で溶出した。溶出液は5.3 ml ずつ分画し、各フラクションをPolin-Lowry法で発色後、750 nm の吸光度の測定により追跡した。35 ~ 40 番目のフラクションP-31、41 ~ 49 番目のフラクションP-32 (TLC; Rf5 = 0.48) および50 ~ 75 番目のフラクションP-33を得た。P-32のフラクションを集め、減圧濃縮した後、凍結乾燥を4回行つてH-P-T-H (1-3-4) N H₂を得た。収量22.8 mg

TLC, Rf5 = 0.48

[α]_D²⁴ = -5.52° (C = 0.2, 0.1 N 酢酸水)

アミノ酸分析: Asp 4.00 (4), Ser 2.34 (3), Glu 4.80 (5), Gly 1.11 (1), Val 3.18 (3),

35 ~ 60 番目のフラクションP-1, 61 ~ 85 番目のフラクションP-2, 86 ~ 115 番目のフラクションP-3および116 ~ 150 番目のフラクションP-4を得た。各フラクションを集めて凍結乾燥し、水酸化アンモニウムを除くため、水を加え3回凍結乾燥してP-1の粉末2.5 mg (収率5.4%), P-2の粉末20.5 mg (収率14.5%), P-3の粉末41.5 mg (収率29.6%) およびP-4の粉末31.0 mg (収率22.1%) を得た。

P-3の粉末を1 N 酢酸水3 ml に溶かし、セファデックスG-50のカラム (2.8 × 94 cm) にチャージし、1 N 酢酸水でグルコースを洗脱した。溶出液を10 ml ずつ分画し、各フラクションを280 nm で追跡し、39 ~ 49 番目のフラクションを集めて凍結乾燥して粉末40 mg を得た。

上記粉末を水5 ml に溶かし、ジチオスレイトール5.3 mgを加えて30℃で48時間還元した。反応液をセファデックスG-25のカラム (1.8 × 140 cm) にチャージし、1 N 酢酸水で溶出した。

- 72 -

Met 1.25 (2), Ile 1.23 (1), Leu 5.20 (5),
Phe 1.00 (1), Lys 2.87 (3), His 2.38 (3),
Arg (2)
アミノ酸分析 [4 M-MSA, 110℃, 48時間]
; Asp 4.11 (4), Ser 2.97 (3), Glu 4.86 (5),
Gly 1.07 (1), Val 3.16 (3), Met 1.55 (2),
Ile 1.01 (1), Leu 5.12 (5), Phe 1.00 (1),
Trp 0.64 (1), Lys 3.20 (3), His 2.76 (3),
Arg 2.00 (2)

アミノ酸分析 [シグマ社製、ロイシンアミノペンタゲル-Lov, No. L-6007, 38℃, 48時間]
; Asp 0.92 (1), Asn 2.88 (3), Ser 2.91 (3),
Glu 2.93 (3), Gln 1.91 (2), Gly 1.03 (1),
Val 3.11 (3), Met 1.84 (2), Ile 0.94 (1),
Leu 4.95 (5), Phe 1.00 (1), Trp 0.78 (1),
Lys 3.25 (3), His 2.58 (3), Arg 1.99 (2)

元素分析 [C₁₀H₁₂N₂O₅ 82.90 C₁₀H₁₂COOH · 1.5

H₂Oとして]

	C %	H %	N %
計算値	48.50	7.32	15.92

測定値 48.55 7.65 15.79

特開昭58-56052(20)

高速液体クロマトグラフィー

カラム: μ Bondapak C₁₈ (0.25" \times 1')

緩衝液: 0.1%酢酸含有0.1Mリン酸とアセ
トニトリルの30:70 \sim 50:50の

面積型検出勾配

流速: 1 ml/分

検出: 280 nm

結果: 7.76分に1スポット検出

ディスク等電点電気泳動(8M尿素ゲル, pH
3 \sim 10, 長さ0.5 \times 6 cm, 1 mA, 200 V);
pH 10.0より0.75 cmの位置に1つのバンドのみを
有する。

PTH活性: ラット腎によるPTHレセプター
アッセイの結果は5100U/mgであつて、h-PTH
(1-34)(東洋醸造社製, 3300U/mg)より
1.5倍も活性を有する。
の

特許出願人
東洋醸造株式会社
代表者 伊東 高 士 馬

- 75 -